OMAGGIO

R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA

LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

IMPERIAL COLLEGE
11 JULY 1935
INSTITUTE

110

G. LUCHETTI

SUL METODO BLASTOMICETICO DI DETERMINAZIONE DELL'ASSIMILABILITÀ DEI FOSFATI.

Estratto dal *Bollettino del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa*
Volume XI - Anno 1935

PISA, STAB. TIP. G. CURSI & FIGLI
1935 - XIII

G. LUCHETTI

SUL METODO BLASTOMICETICO DI DETERMINAZIONE DELL' ASSIMILABILITÀ DEI FOSFATI.

RIASSUNTO: *L'A. ha ripreso in esame il metodo blastomicetico proposto nel 1924 da Lumia per la determinazione della assimilabilità dei fosfati e vi ha introdotto alcune modificazioni atte a renderlo utilizzabile, senza peraltro riuscire nell' intento.*

Però presenta un metodo batteriologico, affine al precedente, il quale, se convenientemente elaborato, lascia prevedere la possibilità di ottenere buoni risultati.

In un nostro precedente lavoro (1) citammo alcuni metodi proposti per la determinazione della assimilabilità dei concimi fosfatici; fra questi il metodo LUMIA (2) che riassumiamo brevemente.

Il LUMIA propone, per tale determinazione, di porre in un tubo graduato da cc. 60, cc. 5 di adatta soluzione nutritiva, mmg. 6 di fosfato bipotassico e cc. 1 di stemperamento acquoso, 0,8 : 100 di lievito.

Un tubo analogo si prepara con gli stessi liquidi ma con il fosfato in esame in luogo del fosfato potassico, in quantità equimolecolari. I due tubi si capovolgono sopra bagni a mercurio e si osservano i volumi di gas svolti in ciascuno dalla attività fermentativa del *Saccaromyces cerevisiae.*

Tale metodo è basato sul fatto che il saccaromicete in parola esige per la sua nutrizione forti dosi di fosforo, in modo che in presenza di fosfati poco assimilabili, si avranno, in confronto al tubo di controllo con fosfato bipotassico, minori volumi di gas.

---

(1) – G. LUCHETTI – *Sul metodo "batteriochimico „ per la valutazione della assimilabilità dei fosfati.* Mem. R. Acc. Naz. dei Lincei, Roma, 1934.

(2) – C. LUMIA – *Nuovo metodo di valutazione della assimilabilità di materiali diversi concimanti.* Actes IV Conf. Int. de Pédologie, Vol. III p. 236, Roma, 1926.

La semplicità del metodo LUMIA in confronto agli altri metodi proposti, ci indusse, dopo avere elaborato il nostro precedente metodo " batteriochimico „, a prenderlo in esame per constatare se esso realmente risponda allo scopo e per confrontarne i risultati con quelli già da noi ottenuti per i diversi fosfati esaminati, sia con il metodo suddetto, che con quello diretto dell' analisi delle ceneri delle piante concimate con vari concimi fosfatici.

Ritenemmo però opportuno apportare al metodo LUMIA alcune modifiche che qui esponiamo.

Anzitutto è da osservare che nel metodo LUMIA non si procede alla sterilizzazione della soluzione nutritiva e del fosfato in essa introdotto, ciò che a nostro parere può infirmare un metodo che si basa essenzialmente sulla monocoltura e cioè sulla attività di un solo microrganismo.

Inoltre, la tecnica usata da LUMIA non appare invero ben chiara dalla descrizione dell'Autore.

Esperienza I. – In base ai rilievi suesposti allestimmo la I esperienza operando come segue: in 6 beute da cc. 250 versammo cc. 200 della soluzione seguente: (1)

acqua di condottura	1000
saccarosio	100
asparagina	2,5
solfato di magnesio	8,5
solfato di potassio	8,5

quindi sterilizzammo in autoclave per un' ora, a 120°C.

Le sei beute, che dovevano servire per una prima esperienza orientativa, dovevano inoltre contenere: una coppia, fosfato monopotassico in ragione del 5 ‰, un' altra, fosfato tricalcico in quantità equimolecolare, la terza nessuna sorgente di fosforo.

(1) – R. PEROTTI – *Tecnica di Biologia Vegetale applicata all'Agricoltura*, Roma, 1924, pag. 254.

Alla prima coppia aggiungemmo il fosfato monopotassico prima della sterilizzazione, per le seconde invece ritenemmo opportuno sterilizzare a parte il fosfato tricalcico, in piccoli tubetti di vetro chiusi con ovatta, nella stufa a secco a 170°C. ed aggiungerlo dopo la sterilizzazione, per evitare una parziale solubilizzazione del fosfato stesso per effetto della sterilizzazione.

Ponemmo le beute in autoclave chiudendole con tappi di ovatta. Contemporaneamente allestimmo sei apparecchi per la raccolta e la misura del gas prodotto dalla fermentazione.

Tali apparecchi, il cui complesso è visibile in fig. 1, erano costituiti da una beuta (la stessa che conteneva il liquido nella steri-

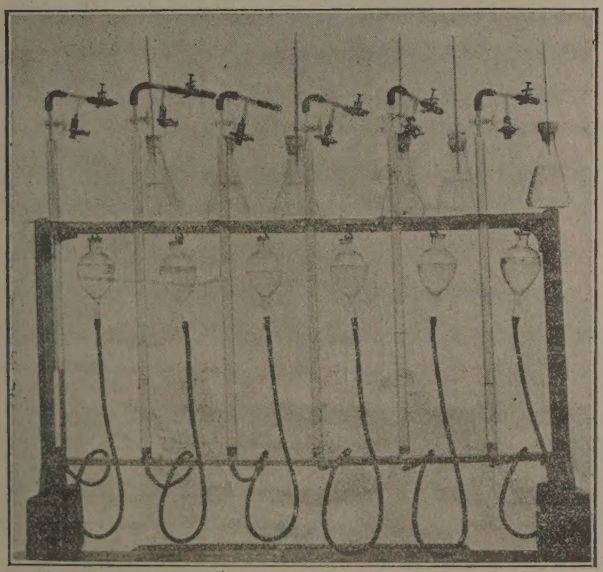

Fig. 1

lizzazione) chiusa da un tappo di gomma a due fori per uno dei quali passava un termometro mentre per l'altro si operava il raccordo con una buretta da cc. 100, attraverso una canna di vetro a T.

La buretta era del tipo a graduazione rovescia e, cioè, con la

numerazione dei centimetri cubici partenti dal robinetto, graduata in 2/10 di centimetro cubo. La sua estremità inferiore recava un tappo di gomma con un foro attraversato da una canna di vetro mediante la quale era unita, attraverso un lungo tubo di gomma, ad una bolla da azotometri.

La buretta e parte della bolla erano pieni di acqua distillata sormontata nelle due superfici libere da uno strato di olio di paraffina il cui ufficio era quello di evitare evaporazione e scioglimento di anidride carbonica nell' acqua attraverso la superficie di contatto.

I particolari dell' attacco buretta-beuta sono ben visibili nel disegno in fig. 2.

Per mettere in funzione l'apparecchio immergevamo il tappo di gomma, con il termometro e la canna di vetro, in alcool assoluto

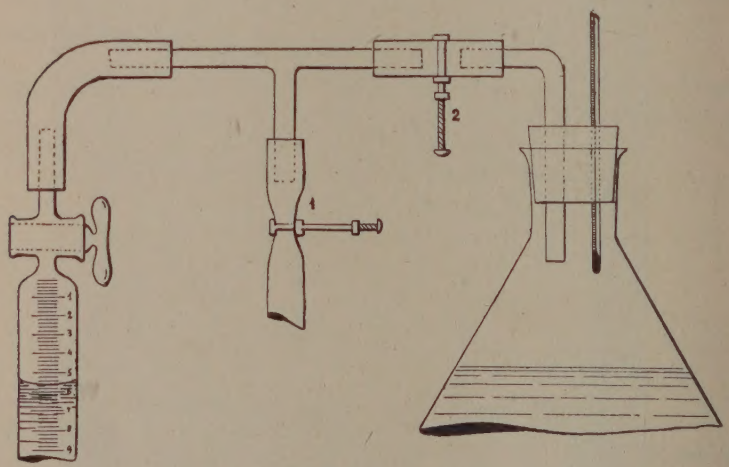

Fig. 2

per un certo tempo, lo estraevamo lasciandone evaporare per alcuni istanti l'alcool e lo sostituivamo al tappo di ovatta della beuta, con la celerità necessaria ad evitare inquinamenti, dopo avere inoculato il liquido ed eventualmente aggiunto il fosfato.

Inoculavamo con cc. 1 di coltura di tre giorni di *Saccaromyces*

cerevisiae in brodo di fagiuoli, agitando prima di prelevare il materiale d' innesto.

Appena pronto l'apparecchio portavamo a zero il liquido nella buretta operando come segue : chiudevamo il morsetto indicato nella fig. 2, con il N. 2 ed aprivamo contemporaneamente il morsetto N. 1 ed il robinetto; sollevando la bolla da azotometro facevamo coincidere il menisco del liquido con lo zero della graduazione della buretta e richiudevamo il morsetto N. 1 riaprendo invece il N. 2. Sollevando quindi la bolla, in modo da portare il livello del liquido in questa all' altezza dello zero della buretta verificavamo che la superficie del liquido nell' interno della buretta, fosse a zero ripetendo eventualmente l' operazione precedente fino a raggiungere lo scopo.

I sei apparecchi, montati su uno stesso sostegno come si vede in fig. 1 erano posti in termostato a 24°C.

Ogni dodici ore eseguivamo la lettura del volume di gas svolto in ogni apparecchio, portando alla stessa altezza le superfici del liquido della buretta e della bolla, e la lettura della temperatura nell' interno di ogni apparecchio a mezzo dei relativi termometri. A parte leggevamo la pressione barometrica su un barometro Fortin.

Riducevamo i volumi di gas, a mezzo di tabelle di correzione per la temperatura e la pressione, a grammi di CO_2.

Riportiamo i risultati ottenuti in questa prima esperienza nella tabella I, in cui gli apparecchi N. 1 e 2 costituiscono la serie senza fosfato, i N. 3 e 4 la serie con fosfato monopotassico ed i N. 5 e 6 quelle con fosfato tricalcico.

Prima di procedere oltre diciamo che ogni qualvolta prevedevamo che la quantità di gas che si sarebbe svolta nelle 12 ore successive alla lettura avesse potuto, sommata alle quantità precedenti, oltrepassare i cc. 100, riportavamo l' apparecchio a zero prendendone nota in apposito registro.

L' esperienza fu sospesa dopo 108 ore perchè dopo tale periodo, avendo l'attività fermentativa raggiunto la sua massima intensità, si formavano in dodici ore quantità così forti di gas da superare di molto i cc. 100 disponibili, ragione per cui si avevano perdite, delle quali era impossibile misurare l' entità attraverso il tubo di gomma della bolla.

Riportiamo i risultati di questa esperienza nella tabella I.

TABELLA I.

Dopo ore	Grammi di CO_2 prodotta nell' apparecchio N.°					
	1	2	3	4	5	6
12	—	—	—	—	—	—
24	—	—	—	—	—	—
36	—	—	—	0,0215	—	—
48	0,0005	—	0,0237	0,0952	0,0552	0,0214
60	0,0085	0,0098	0,1453	0,2454	0,2420	0,1936
72	0,0180	0,0212	0,2602	0,3710	0,4125	0,3401
84	0,0191	0,0262	0,3892	0,5868	0,6333	0,5450
96	0,0261	0,0352	0,5143	0,7373	0,8058	0,7068
108	0,0261	0,0352	0,6883	1,1315	0,9232	0,9080

Questa prima esperienza, a carattere puramente orientativo, mise in evidenza due fatti principali dei quali però non si può tenere che un conto relativo per la breve durata dell' esperienza stessa e per gli inevitabili errori ai quali si andò incontro nella applicazione del metodo. Il primo fatto da rilevare è che il *Saccharomyces cerevisiae*, anche in assenza di sorgente di fosforo nella soluzione nutritiva, produce leggere quantità di gas; il secondo è che, facendo la media delle quantità di gas prodotto dalle singole coppie dopo 108 ore di coltura e nelle condizioni sperimentate, l' assimilabilità del fosfato tricalcico risulterebbe uguale, anzi di pochissimo superiore, a quella del fosfato monopotassico.

Esperienza II. – Dai risultati della esperienza precedente noi traemmo le seguenti deduzioni:

I – la quantità di saccarosio introdotta nella soluzione nutritiva

è troppo forte e dà sviluppi di gas incompatibili con il volume delle burette.

II – la quantità di fosfato aggiunta è anch' essa troppo forte.

I rimedi non potevano essere che due per il primo inconveniente: o ridurre la quantità di soluzione nutritiva oppure ridurre in questa la percentuale di saccarosio.

Ci attenemmo al secondo metodo perchè riducendo il volume della soluzione nutritiva saremmo andati incontro ad un altro inconveniente non meno grave, quale sarebbe stato quello di dover pesare, sterilizzare ed introdurre nelle beute quantità tanto piccole di fosfati che la minima perdita avrebbe influito moltissimo sui risultati dell' esperienza.

Preparammo perciò per la seconda esperienza una soluzione nutritiva della composizione seguente:

acqua di condottura	1000
saccarosio	10
asparagina	5,1
solfato di magnesio	8,5
solfato di potassio	8,5
anidride fosforica	0,5-1

Questa seconda esperienza fu ripetuta due volte perchè la prima volta che la allestimmo si verificarono perdite nei tubi di gomma delle congiunzioni degli apparechi che ne falsarono totalmente i risultati.

Per evitare ciò, nel ripetere l'esperienza avemmo cura di usare tubo di gomma a pareti molto spesse (tubo per pompe aspiranti) e, siccome ciò non bastava ad assicurare una tenuta perfetta, ricorremmo all' artificio di bruciare l'estremità del tubo di gomma prima di introdurvi la canna di vetro, in modo che la gomma, fluidificata al calore e solidificata nel raffreddamento servisse da mastice. Riuscimmo così ad ottenere una tenuta perfetta in cinque apparecchi. Il N. 3 non riuscimmo a metterlo in grado di funzionare, o meglio, a metà dell'esperienza si verificarono di nuovo perdite che ci consigliarono di metterlo fuori uso.

Nella presente esperienza gli apparecchi N. 1 e 2 funziona-

rono da controllo con il 0,5 ‰ di P_2O_5 sotto forma di fosfato monopotassico; i N. 3 e 4 (il N. 3, ripetiamo, fu messo fuori uso a metà dell' esperienza) servirono alla valutazione del fosfato tricalcico

Tabella II.

Dopo ore	Grammi di CO_2 prodotti nell' apparecchio N.°					
	1	2	3	4	5	9
12	—	—	—	—	—	—
24	—	—	—	—	—	—
36	—	—	—	—	—	—
48	—	—	—	—	—	—
60	0,0097	0,0175	—	0,0011	—	—
72	0,0128	0,0209	0,0037	0,0064	—	—
84	0,0157	0,0232	0,0068	0,0093	—	—
96	0,0203	0,0275	0,0109	0,0151	0,0015	0,0045
108	0,0245	0,0305	0,0163	0,0192	0,0026	0,0083
120	0,0298	0,0351	0,0221	0,0253	0,0049	0,0132
132	0,0331	0,0380	0,0284	0,0300	0,0066	0,0180
144	0,0382	0,0423	?	0,0356	0,0086	0,0236
156	0,0457	0,0463	?	0,0476	0,0120	0,0307
168	0,0526	0,0553	?	0,0612	0,0157	0,0407
180	0,0597	0,0620	?	0,0758	0,0198	0,0538
192	0,0675	0,0697	?	0,0962	0,0235	0,0694
204	0,0844	0,0844	?	0,1177	0,0324	0,0848
216	0,0954	0,0948	?	0,1287	0,0487	0,0969
228	0,1045	0,1030	?	0,1395	0,0565	0,1064
240	0,1138	0,1120	?	0,1532	0,0891	0,1168
252	0,1328	0,1362	?	0,2027	0,1123	0,1369
264	0,1484	0,1481	?	0,2391	0,2034	0,1611
276	0,1515	0,1584	?	0,2510	0,2359	0,1728
288	0,1625	0,1630	?	0,2696	0,2891	0,2020
300	0,1729	0,1704	?	0,2960	0,3306	0,2295
312	0,1837	0,1819	?	0,3302	0,3593	0,2777
324	0,2290	0,2270	?	0,3934	0,3847	0,4028

pure nella quantità di 0,5 ‰ di anidride fosforica, i N. 5 e 6 invece servirono a vedere l'influenza della quantità di fosfato tricalcico sullo sviluppo di gas e ad essi aggiungemmo detto fosfato in quantità pari all'1 ‰ di P_2O_5.

Il volume del liquido nei singoli recipienti si era dimostrato insufficiente nelle precedenti esperienze, in quanto l'aria che lo sovrastava mutava di volume ad ogni minimo cambiamento di temperatura, falsando la lettura. Perciò lo portammo nella presente esperienza a cc. 250.

I risultati ottenuti in questa esperienza sono esposti nella tab. II.

Dai dati esposti nella Tabella è facile arguire perchè dopo tredici giorni avevamo dovuto troncare l'esperienza. Anzitutto, perchè confrontando i valori finali della I coppia e quelli dell'apparecchio N. 4 si osserva che, secondo questa esperienza, il fosfato tricalcico avrebbe avuto un'assimilabilità pari circa al 172 % di quella del fosfato monopotassico, ciò che è per lo meno inverosimile; in secondo luogo, perchè il fosfato tricalcico aggiunto in quantità del 0.5 o dell'1 ‰ avrebbe prodotto lo stesso effetto.

Questo per quanto si può trarre dalla semplice analisi dei risultati finali.

Seguendo poi l'esperienza per tredici giorni avemmo anche modo di notare altri inconvenienti e fra questi il fatto che gran parte della CO_2 svolta dalla fermentazione rimane disciolta nel liquido di coltura e si libera alla minima scossa impressa ai recipienti con notevole alterazione delle letture alla buretta. Dopo qualche giorno di coltura, quando la fermentazione aveva raggiunto un certo grado di attività, agitando le beute, il volume del gas aumentava talvolta anche di qualche diecina di centimetri cubici.

Tutto sommato il metodo non si è rivelato nè così semplice quanto a prima vista sarebbe potuto sembrare, nè adatto ad una valutazione esatta della assimilabilità dei fosfati, quale si richiede dall'importanza pratica di essa.

Purtuttavia, prima di abbandonarlo definitivamente, tentammo ancora una modificazione del metodo che esponiamo nelle tre esperienze che seguono.

Esperienza III. – Visti gli inconvenienti che si erano verificati

con il metodo precedente, pensammo che fosse più conveniente di abbandonare l' idea della raccolta e misurazione del gas sviluppato dall' attività del fermento.

A questa operazione sostituimmo invece quella della misura della pressione sviluppata dal gas prodotto dal *Saccharomyces cerevisiae*.

Per una prova preliminare ci servimmo di una beuta di vetro molto spesso con tubulatura laterale (beuta per filtrare con aspirazione) della capacità di cc. 250; la riempimmo del liquido culturale con fosfato potassico fino all'altezza della tubulatura laterale che raccordammo con un manometro a mercurio. Il tutto, naturalmente, dopo sterilizzazione del liquido di coltura ed inoculazione con *Saccharomyces cerevisiae* e con le consuete cure onde evitare inquinamenti. Ponemmo il tutto in termostato a 24° C. e prendemmo nota delle pressioni ogni dodici ore.

Riportiamo i risultati nella Tabella III.

Tabella III. – *Pressione in mm. di mercurio sviluppata dalla coltura*

Dopo ore	mm.	Dopo ore	mm
12	— 14	132	+ 310
24	— 40	144	+ 342
36	+ 8	156	+ 420
48	+ 20	168	+ 452
60	+ 80	180	+ 484
72	+ 122	192	+ 510
84	+ 140	204	+ 530
96	+ 185	216	+ 565
108	+ 220	228	+ 615
120	+ 280	240	+ 615

Dal 10° al 12° giorno di coltura la pressione rimase stazionaria, e per ciò sospendemmo l' esperienza. I risultati di questa prima

prova dimostrarono che il principio su cui essa era basata poteva esser preso come punto di partenza per ulteriori esperienze.

Esperienza IV. – In questa esperienza procedemmo ad una prova comparativa tra fosfato monopotassico e fosfato tricalcico. Per far ciò costruimmo 8 manometri differenziali a mercurio piegando a U alcune lunghe canne di vetro di diametro conveniente, in modo da poter misurare con essi, pressioni fino a mm. 1000 circa di mercurio.

Seguendo la tecnica descritta nella prima esperienza, allestimmo otto beute (del tipo a pressione, da cc. 250) con il liquido colturale seguente:

acqua di condottura	1000
glucosio	40
asparagina	2,5
solfato di magnesio	8,5
solfato di potassio	8,5

Dividemmo le otto beute in quattro coppie ed aggiungemmo ad ogni coppia i seguenti fosfati:

coppia I (apparecchi N. 1 e 2): fosfato tricalcico = 1 $^{0}/_{00}$ P_2O_5
coppia II („ N. 4 e 4): „ „ = 0,5$^{0}/_{00}$ P_2O_5
coppia III („ N. 5 e 6): „ „ = 0,2$^{0}/_{00}$ P_2O_5
coppia IV („ N. 7 e 8): „ monopotas. = 0,5$^{0}/_{00}$ P_2O_5

per studiare sia l'influenza della qualità del fosfato, sia quella della quantità di fosfato tricalcico.

I fosfati erano stati sterilizzati in precedenza, in tubetti, a secco, come per la prima esperienza.

Collocammo beute e manometri su apposito sostegno dopo averli raccordati come nella esperienza precedente.

Da notare che per l'altezza di oltre un metro l'apparecchio non fu possibile di metterlo in termostato; d'altronde, approfittando della buona stagione in cui la temperatura ambiente dei Laboratori si manteneva intorno ai 22°-24° C., ritenemmo che potesse rimanere fuori di esso.

Per questa ragione non eseguimmo le letture ogni dodici ore

ma ogni ventiquattro: sempre alla stessa ora del giorno onde evitare almemo parte degli errori dovuti a sbalzi termici.

Nella Tabella IV esponiamo i risultati ottenuti in queste prove.

Tabella IV.

Dopo ore	Pressione (in millimetri di Hg) sviluppata nell'apparecchio N.°							
	1	2	3	4	5	6	7	8
24	—	—	—	—	—	—	180	52
48	45	—	22	—	—	178	643	155
72	200	—	80	10	8	304	697	380
96	307	58	123	47	20	364	766	546
120	340	111	162	85	30	651	768	616
144	332	117	227	130	70	668	798	652
168	323	146	412	263	146	738	844	722
192	304	132	360	322	128	700	896	704
216	285	124	345	302	113	681	871	668

Per confrontare più agevolmente i risultati riportiamo qui sotto le medie delle pressioni massime di ogni coppia:

coppia I mm. 243 = fosfato tricalcico 1 ‰ in P_2O_5
„ II „ 367 = „ „ 0,5‰ in P_2O_5
„ III „ 442 = „ „ 0,2‰ in P_2O_5
„ IV „ 809 = „ monopotas. 0,5‰ in P_2O_5

Da questi è facile vedere che la pressione massima compete alla coltura con fosfato monopotassico, come era da attendersi: quanto al fosfato tricalcico però i risultati si dimostrano esattamente opposti a quelli prevedibili in quanto che la pressione è risultata inversamente proporzionale alla quantità di fosfato tricalcico aggiunto.

L'unica spiegazione del fatto sarebbe da ricercare, a nostro giudizio, nella reazione alcalina che il fosfato tricalcico determina nel

mezzo di coltura, contrariamente a quanto avviene per il fosfato monopotassico. E ciò è avvalorato dalla ciscostanza che i saccaromiceti, come tutti i funghi, preferiscono l'ambiente acido a quello alcalino.

Altro fatto da notare in questa esperienza è la discordanza dei risultati nei due apparecchi costituenti le coppie, specialmente per le coppie I e III.

Per queste ragioni non credemmo opportuno spingere più oltre le ricerche su questo metodo basato sulla attività dei saccaromiceti. Tentammo però un'ultima esperienza che riportiamo qui appresso.

Esperienza V. – Abbandonato, per le ragioni suesposte, il metodo blastomicetico, tentammo in quest' ultima esperienza un altro metodo basato sullo stesso principio ma sfruttando l'attività di colture brute (prevalentemente batteriche) anzichè colture pure. Ciò per varie ragioni; non ultima quella di riportarci il più possibile a quelle che sono le cause di solubilizzazione dei fosfati nel suolo e di utilizzare per la determinazione della loro assimilabilità, quegli stessi microrganismi che agiscono realmente nel suolo.

Perciò nelle beute usate nell' esperienza precedente distribuimmo, fino a riempirle completamente e dopo averle raccordate ai tubi manometrici, la seguente soluzione nutritiva:

acqua di condottura	1000
saccarosio	50
nitrato ammonico	2
solfato di magnesio	0,1
solfato di manganese	0,1
cloruro ferrico	0,1
cloruro sodico	tr.
solfato potassico	tr.
sorgente fosforata	variabile

Inoculammo ogni beuta con cc. 1 di stemperamento di una parte di terra in una di acqua e chiudemmo superiormente le beute con tappi di gomma.

Ogni 24 ore leggevamo le pressioni sviluppatesi nei recipienti; riportiamo le letture nella Tabella V.

Tabella V.

Dopo ore	Pressione (in mm. di Hg) sviluppata nell' apparecchio N.°							
	1	2	3	4	5	6	7	8
24	—	—	—	—	—	—	—	—
48	—	82	32	—	68	—	—	—
72	46	126	504	64	138	36	42	58
96	72	196	144	108	200	70	68	76
120	148	198	198	192	228	116	130	88
144	180	200	200	266	234	176	148	96
168	216	198	208	318	226	212	144	92
192	226	194	208	318	226	292	148	92
216	222	200	202	318	226	290	140	84
240	236	248	208	318	226	292	140	88
264	252	256	242	318	226	292	148	88
288	276	308	276	318	260	292	148	112
312	316	340	290	318	286	312	170	112
336	346	366	320	318	298	324	200	110
360	336	368	320	324	306	330	196	144
384	358	384	324	320	300	342	198	148
408	368	410	320	326	324	346	220	154
432	372	440	324	326	332	362	246	188
456	376	440	326	326	336	366	262	196
480	372	436	322	320	328	364	262	196

Dall' esame delle pressioni massime raggiunte nei vari recipienti si vede come l'andamento del fenomeno sia molto più regolare in questa esperienza che nella precedente rispetto alla concordanza di

risultati nei due apparecchi delle singole coppie; inoltre, confrontando le medie delle pressioni massime nelle quattro coppie, che riportiamo:

coppia I	mm. 408 =	fosfato tricalcico	1 ‰	in P_2O_5
coppia II	„ 326 =	„ „	0,5‰	in P_2O_5
coppia III	„ 346 =	„ „	0,2‰	in P_2O_5
coppia IV	„ 229 =	„ monopotas.	0,5%	in P_2O_5

si osserva che la pressione non è così decisamente in proporzione inversa del fosfato tricalcico aggiunto come si verificava nella esperienza precedente: vi è un andamento simile fra le II e la III coppia, ma molto meno marcato.

Ciò che invece si verifica in questa esperienza è che il fosfato tricalcico risulta, in qualsiasi proporzione, più assimilabile del fosfato monopotassico. Ciò forse per la acidità introdotta con il fosfato monopotassico che rende il liquido colturale meno adatto alla vita batterica.

Così modificato il metodo potrebbe forse, con opportune varianti, essere più o meno adatto allo scopo, a patto di prendere come controllo colture con fosfato tricalcico invece che con fosfato monopotassico.

Senonchè bisognerebbe usare manometri di altro tipo, più adatti ad essere collocati in normali termostati; tali ad esempio dei barometri metallici di sufficiente sensibilità.

Ciò specialmente perchè fuori termostato le pressioni risentono sensibilmente delle variazioni di temperatura, come si può anche osservare dalla tabella V. seguendo l' andamento delle pressioni durante i venti giorni di coltura: le pressioni subiscono talvolta delle diminuzioni in corrispondenza appunto delle giornate di temperatura più bassa.

Altra importantissima variante da apportare al metodo, specie per accrescerne la sensibilità, noi crediamo possa essere quella di ridurre la pressione di lavoro dei saccaromiceti (e contemporaneamente quella dei manometri, con evidente vantaggio riguardo alla loro sensibilità e precisione).

Ciò si può ottenere attenendosi alla nostra ultima esperienza ed applicando le seguenti norme:

I - eseguire le colture in beute di vetro spesso, senza tubulatura laterale.

II - chiudere le beute con un tappo di gomma a due fori applicando ad uno di essi direttamente il manometro (potrà bastare, forse, anche un manometro con scala fino a 0,5 Kg/cm^2) ed all' altro un robinetto di scarico del gas.

III - aprire il robinetto di scarico subito dopo ogni lettura di pressione in modo da riportare il barometro a zero e facilitare la formazione di nuovo gas nelle colture.

CONCLUSIONI

Riassumendo, i risultati delle esperienze da noi compiute ci portano a concludere che il metodo blastomicetico LUMIA, almeno nelle modificazioni da noi apportate, non si presta ad una valutazione anche approssimata della assimilabilità dei fosfati, nè con la raccolta del gas prodotto dalla fermentazione dello zucchero, nè con la misura delle pressioni sviluppate in seno alle colture.

Un metodo di questo tipo, invece, ma basato sulla attività di colture brute, potrebbe essere elaborato sulla scorta dei risultati dell' ultima esperienza da noi compiuta al riguardo ed introducendo alcune modificazioni da noi indicate od altre che eventualmente si rendessero necessarie.

Ciononostante non reputiamo che il metodo in parola, se pur molto più semplice, più rapido e meno laborioso, possa dare risultati più esatti del metodo „batteriochimico„ da noi già elaborato e di cui abbiamo a suo tempo riferito.

Pisa, Laboratorio di Biologia vegetale
del R. Istituto Superiore Agrario

(Presentata il 15 febbraio 1935 - XIII)